Aus der Universitäts-Augenklinik Würzburg

Direktor: Prof. Dr. med. W. Reichling

EXPERIMENTELLE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS VERHALTEN SÄURELÖSLICHER PHOSPHORVERBINDUNGEN, INSBESONDERE VON ADENOSINTRIPHOSPHAT UND ADENOSINDIPHOSPHAT IN DEN HORNHAUTGEWEBEN

Habilitationsschrift

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät der

Julius - Maximilians - Universität Würzburg

zur

Erlangung der Venia legendi

für das Fach Augenheilkunde

vorgelegt von

Dr. med. William Münich

Würzburg 1956

v. Graefes Archiv für Ophthalmologie, Bd. 158, S. 532—557 (1957)

Aus der Universitäts-Augenklinik Würzburg
(Direktor: Prof. Dr. W. Reichling)

Experimentelle Untersuchungen über das Verhalten säurelöslicher Phosphorverbindungen, insbesondere von Adenosintriphosphat und Adenosindiphosphat in den Hornhautgeweben

Von
W. Münich

Habilitationsschrift
24. 9. 56

A. Einleitung und Problemstellung

Adenosintriphosphat (ATP) und Adenosindiphosphat (ADP) sind für die Aufrechterhaltung des Energietransportes innerhalb lebender Zellen von fundamentaler Bedeutung. Der größte Teil der durch die Zellatmung freigesetzten Energie wird zur Synthese energiereichen Phosphats verwendet, das die entstandene Energie sogleich aufnimmt und speichert, um sie bei der Ausübung energieverzehrender Funktionen der Zelle wieder abzugeben. Die Aufspaltung energiereicher Phosphorverbindungen ist somit eine unmittelbare Quelle für energetische Leistungen der Zelle.

Wie auch andere Organe des Körpers benötigt die Hornhaut zur Aufrechterhaltung ihres Stoffwechsels energieliefernde Reaktionen, für deren Freisetzung und Übertragung ihr in der Bildung energiereicher Phosphorverbindungen sicherlich eine sehr wichtige Möglichkeit zur Verfügung steht. Es war deshalb als wahrscheinlich anzunehmen, daß auch in der Hornhaut zwischen dem Phosphorstoffwechsel einerseits und den energieverbrauchenden Stoffwechselvorgängen sowie den funktionellen Leistungen andererseits enge Beziehungen bestehen. Untersuchungen, die sich mit dem Verhalten energetisch wichtiger Phosphorverbindungen in den Hornhautgeweben befassen, sind kaum vorhanden. Lediglich Herrmann u. Hickman haben im Rahmen ihrer Studien über den Hornhautstoffwechsel einige experimentelle Daten geliefert. Wir haben deshalb Untersuchungen an Kalbs- und Kaninchenhornhäuten angestellt, die zur Klärung dieser Fragen beitragen sollen. Da ATP und ADP zu den wichtigsten energiereichen Phosphorverbindungen der Zelle gehören, wurden sie getrennt bestimmt und ihr Verhalten unter verschiedenen experimentellen Bedingungen geprüft.

B. Methodik

Die Untersuchungen wurden an frischen Kalbs- und Kaninchenhornhäuten durchgeführt.

Die Kalbshornhäute wurden in einer von Münich angegebenen Weise [s. W. Münich, Arzneimittelforsch. **6**, 729 (1956)] bearbeitet und mit der entsprechenden

Testsubstanz in einer nach den Angaben von MERRIAM u. KINSEY zusammengestellten Nährlösung bei einer Temperatur von 37° C 60 min lang bebrütet. Die andere Hornhauthälfte diente zur Kontrolle. Anschließend wurde von den Hornhauthälften ein schmaler Gewebsstreifen zur Bestimmung des Gesamt-P abgetrennt und ein trichloressigsaurer Extrakt hergestellt, aus dem auf papierchromatographischem Wege (FLECKENSTEIN u. JANKE; GERLACH, WEBER u. DÖRING) 4 Phosphatfraktionen getrennt wurden (Fraktion I: Anorganischer P + Kreatin-P; Fraktion II: Organischer Rest-P; Fraktion III: ATP; Fraktion IV: ADP). Die Sichtbarmachung der ATP- und ADP-haltigen Stellen auf den Chromatogrammen erfolgte nach dem Photoprintverfahren nach MARKHAM u. SMITH. Anorganisches Phosphat wurde nach der Methode von HANES u. ISHERWOOD sichtbar gemacht. Die phosphorhaltigen Papierareale wurden ausgeschnitten und verascht. Sodann wurde die quantitative P-Bestimmung nach der Methode von BERENBLUM u. CHAIN durchgeführt. Die Werte wurden in γ P je Gramm Hornhauttrockengewicht ausgedrückt.

Für Untersuchungen an Kaninchen wurden Tiere männlichen und weiblichen Geschlechtes verwendet. Eine Stunde vor der Tötung erhielt jedes Tier am rechten und am linken Auge subconjunctival ^{32}P in physiologischer NaCl-Lösung in einer Menge verabfolgt, die einem Wert von $4 \cdot 10^6$ Impulsen je Minute und Milliliter Flüssigkeit entsprach. Die Tötung der Tiere erfolgte durch Nackenschlag. Unmittelbar danach wurden die Hornhäute beider Augen excidiert und gesondert bearbeitet. Eine Bebrütung fand nicht statt. Die Herstellung des Hornhautextraktes, die chromatographische Arbeitsweise und die quantitative P-Bestimmung erfolgte wie bei den Kalbshornhäuten beschrieben. Die Bestimmung des in die gesamte Hornhaut und in die einzelnenFraktionen aufgenommenen ^{32}P erfolgte mit Hilfe eines Flüssigkeitszählrohres (FHZ 41) und eines Strahlungsmeßgerätes (FH 41 A). Die Messung wurde vorgenommen, nachdem die einzelnen Papierareale mit je 0,1 ml Veraschungsreagens verascht und 7 ml Aqua dest. hinzugefügt waren. Anschließend wurde die quantitative colorimetrische P-Bestimmung durchgeführt. Zwischen den einzelnen Arbeitsgängen wurden keine Pausen eingeschaltet. ^{32}P befand sich in Form von Orthophosphat in der physiologischen NaCl-Lösung, die bei jedem Tier am rechten und am linken Auge subconjunctival injiziert wurde.

C. Ergebnisse

I. Untersuchungen an der isolierten überlebenden Kalbscornea

1. Untersuchungen an der normalen Cornea

Die Untersuchungen an normalen Kalbshornhauthälften wurden zur Klärung der Frage durchgeführt, ob im Verhalten der säurelöslichen Phosphate bei den einzelnen Hornhauthälften deutliche Unterschiede bestehen.

Der Gesamt-P der Hornhaut und der Gesamt-P im trichloressigsauren Hornhautextrakt wurden gesondert bestimmt. Der säurelösliche Phosphor im Hornhautextrakt wurde wie oben beschrieben, auf papierchromatographischem Wege in 4 Fraktionen aufgetrennt. Die Fraktion I (Anorganischer P + Kreatin-P) bildet zahlenmäßig die größte Fraktion. Die Fraktion II bildet der organische Rest-P. Wir verstehen darunter das gesamte Phosphat, das nach der Anwendung des 2. Lösungsmittels am Startpunkt zurückbleibt. Die Fraktion III enthält das ATP und die Fraktion IV das ADP.

Derartige Fraktionierungen sind bekanntlich stets mit gewissen Verlusten verbunden, so daß die Summe der Fraktionen I—IV in manchen Fällen den Wert für den säurelöslichen Gesamt-P nicht erreicht. Die hierdurch mögliche Unsicherheit in der Beurteilung der Ergebnisse wird aber dadurch ausgeglichen, daß stets gleichzeitig Kontrollversuche mitgelaufen sind, bei denen analoge Verluste angenommen werden dürfen. In sämtlichen Tabellen wurde die Summe der für die Fraktionen I—IV ermittelten Werte in γ P je Gramm Hornhauttrockengewicht gleich 100 gesetzt und der auf die einzelnen Fraktionen entfallende Wert in Prozent ausgedrückt. Für jede Fraktion wurde die Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) berechnet.

Aus Tabelle 1 geht hervor, daß der bei den einzelnen Hornhauthälften festgestellte prozentuale Unterschied im Verhalten der bei den einzelnen Fraktionen bestimmten Phosphorwerten nicht als signifikant betrachtet werden kann.

Tabelle 1. *Kalbshornhauthälften*

Prozentuale Verteilung des säurelöslichen Hornhautphosphors auf die einzelnen Fraktionen. (Fraktion I + II + III + IV = 100%.) a) Normale Kalbshornhauthälften; b) normale Kalbshornhauthälften.

	Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 13 Einzelmessungen	30,91	31,09	19,97	19,94	27,63	28,69	20,71	20,58
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$>0{,}05$		$>0{,}05$		$>0{,}05$		$>0{,}05$	

2. Untersuchungen an der epithelentblößten Hornhaut

Zahlreiche Untersuchungen an verschiedenen Versuchstieren haben ergeben, daß das Hornhautepithel, das Hornhautstroma und das Hornhautendothel in ihrer chemischen Zusammensetzung und im Verhalten ihres Stoffwechsels deutliche Unterschiede aufweisen (Kohra; Orzalesi; Lee u. Hart; Robbie, Leinfelder u. Duane; Duane; Schall; Schmelzer). Das Hornhautepithel ist sehr reich an Glykogen und an Milchsäure (Herrmann u. a.; Bobbit u. Deuel; Soskin u. Levine). Glykolytische Aktivität wurde in sämtlichen Hornhautschichten nachgewiesen (Herrmann, Moses u. Friedenwald). Das isolierte Stroma verliert jedoch nach mehreren Stunden seine Fähigkeit der Glykolyse. Nur etwa die Hälfte der abgebauten Glucose erscheint im isolierten Stroma als Milchsäure (Herrmann u. Hickman). Das isolierte Stroma scheint nicht in der Lage zu sein, Phosphat von Glycerophosphat auf Glucose zu übertragen. Diese Transphosphorylierung erfordert die Anwesenheit energiereicher Phosphatbindungen, die das isolierte Stroma anscheinend nicht in ausreichendem Maße besitzt.

Die in Tabelle 2 aufgeführten Zahlenwerte stellen Untersuchungsergebnisse dar, die an normalen, mit Epithel bedeckten Kalbshornhauthälften und an solchen, bei denen das Epithel vorher abgeschabt wurde, gewonnen wurden. Sowohl die mit Epithel bedeckte, als auch die nicht mit Epithel bedeckte Hornhauthälfte jedes Auges wurde in Gläschen mit 4 ml Nährlösung nach MERRIAM u. KINSEY eingegeben und 60 min lang bei 37° C bebrütet. Anschließend wurde der trichloressigsaure Hornhautextrakt hergestellt und die einzelnen Fraktionen papierchromatographisch getrennt.

Bei der vergleichenden Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, daß bei den Hornhauthälften ohne Epithel im Durchschnitt der P-Gehalt in Fraktion I erhöht, der P-Gehalt in Fraktion III und IV erniedrigt ist. Die P-Werte der Fraktion II zeigen unterschiedliches Verhalten. Die für Fraktion I und für Fraktion III erhaltenen Werte konnten statistisch gesichert werden.

Untersuchungen am isolierten Corneaepithel führten wegen der geringen, an ein und derselben Hornhaut zur Verfügung stehenden Substanzmenge zu keinem brauchbaren Resultat.

Tabelle 2. *Kalbshornhauthälften*

Prozentuale Verteilung des säurelöslichen Hornhautphosphors auf die einzelnen Fraktionen. (Fraktion I + II + III + IV = 100%). a) Hornhauthälften ohne Epithel; b) Hornhauthälften mit Epithel.

	Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 10 Einzelmessungen	38,84	26,97	22,69	22,43	21,90	29,60	16,56	20,99
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$<0{,}05$		$>0{,}05$		$<0{,}05$		$>0{,}05$	

3. Untersuchungen über den Einfluß verschiedener Faktoren

a) Einfluß von verschiedenen Temperaturgraden. Die Aufrechterhaltung einer konstanten Temperatur ist für den ungestörten Ablauf des Gewebsstoffwechsels von großer Bedeutung. Experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, daß Sauerstoffaufnahme, Dehydrasenaktivität und Wasseraufnahme der Hornhaut weitgehend von der Temperatur abhängig sind (KOHRA; JAEGER; SCHWARTZ, DANES u. LEINFELDER). Die Aufrechterhaltung eines konstanten Wasserniveaus im Gewebe erfordert die Anwesenheit aktiver Stoffwechselprozesse (ROBINSON u. MCCANCE) und kann als energieverbrauchender Prozeß aufgefaßt werden. Ein Absinken der Temperatur führt zu einem Absinken der Energieproduktion.

Wir haben nun Untersuchungen angestellt, die klären sollten, ob für die von uns im Hornhautextrakt getrennten Phosphatfraktionen eine Temperaturabhängigkeit besteht. Die Versuche wurden in folgender Weise durchgeführt: Kalbshornhauthälften wurden in 4 ml Nährlösung nach Merriam u. Kinsey eingelegt und anschließend für die Dauer von 60 min im Brutschrank der gewünschten Temperatur ausgesetzt. Die Kontrollhälften wurden jeweils über den gleichen Zeitraum bei einer Temperatur von 37° C gehalten. Aus Tabelle 4 ist zu ersehen, daß bei einer Temperatur von 85° C stets eine Vermehrung des Phosphatgehaltes der Fraktion I und eine Verminderung des Phosphatgehaltes der sämtlichen übrigen Phosphatfraktionen stattfindet. Die statistische Auswertung ergab einen Wert für P der stets $< 0{,}05$ war. Hornhauthälften, die bei 20° C bebrütet wurden, ließen lediglich bei Fraktion I und Fraktion III einen signifikanten Unterschied gegenüber den Kontrollen erkennen. Bei allen übrigen Fraktionen war $P > 0{,}05$ (Tabelle 3).

Aus den Untersuchungsergebnissen geht klar hervor, daß der P-Gehalt der einzelnen Fraktionen eine deutliche Temperaturabhängigkeit zeigt.

Tabelle 3. *Kalbshornhauthälften*

Prozentuale Verteilung des säurelöslichen Hornhautphosphors auf die einzelnen Fraktionen. (Fraktion I + II + III + IV = 100%.) a) Temperatur 20° C; b) Temperatur 37° C.

	Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 5 Einzelmessungen	33,0	31,74	23,19	23,39	27,76	28,37	16,04	16,49
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$< 0{,}05$		$> 0{,}05$		$< 0{,}05$		$> 0{,}05$	

Tabelle 4. *Kalbshornhauthälften*

Prozentuale Verteilung des säurelöslichen Hornhautphosphors auf die einzelnen Fraktionen. (Fraktion I + II + III + IV = 100%.) a) Temperatur 85° C; b) Temperatur 37° C.

	Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 5 Einzelmessungen	62,05	30,84	12,83	23,50	18,17	28,69	6,94	16,95
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$< 0{,}05$		$< 0{,}05$		$< 0{,}05$		$< 0{,}05$	

b) Einfluß verschiedener Wasserstoffionenkonzentrationen. Für den ungestörten und zweckvollen Ablauf sämtlicher Stoffwechselvorgänge spielt die Wasserstoffionenkonzentration eine besonders bedeutungsvolle

Rolle. Die aerobe und anaerobe Glykolyse des Kaninchenknochenmarkes (Bird, Evans u. Becker), die Formazanbildung in der überlebenden Rindercornea (Jaeger) und der Wasserhaushalt der isolierten überlebenden Kaninchencornea (Schwartz, Danes u. Leinfelder) sind von dem Grade der Wasserstoffionenkonzentration abhängig.

Wir haben deshalb in den folgenden eigenen Untersuchungen die Frage geprüft, ob Veränderungen der Wasserstoffionenkonzentration einen meßbaren Einfluß auf das Verhalten der verschiedenen säurelöslichen Phosphatfraktionen im Hornhautextrakt ausüben. Zu diesem Zwecke wurden Untersuchungen bei p_H 3,5, p_H 5,7, p_H 8,0 und p_H 10,0 angestellt. Als Stammlösung wurde die Nährlösung nach Merriam u. Kinsey verwendet. Die gewünschte p_H-Stufe wurde durch Hinzufügen von n-HCl bzw. n-NaOH bei 37° C eingestellt. Die Isotonie der Lösung wurde gewahrt, indem der NaCl-Gehalt der Stammlösung entsprechend verändert wurde. Zur Kontrolle dienten diejenigen Hornhauthälften, die jeweils bei einem konstanten p_H von 7,2 gehalten wurden. Die aus den Tabellen 5—8 ersichtlichen Ergebnisse lassen eindeutig erkennen, daß bei einem p_H von 3,5 ein deutlicher Einfluß auf das Verhalten der einzelnen säurelöslichen Phosphatfraktionen der Hornhaut ausgeübt wird. Fraktion III und Fraktion IV zeigen gegenüber den bei p_H 7,2 gehaltenen Kontrollen eine deutliche Verminderung ihrer Werte. Die Fraktion I ist durchwegs erhöht, die Fraktion II erniedrigt. Die Abweichung der für die einzelnen Fraktionen bestimmten Mittelwerte ist in allen Fällen statistisch signifikant ($P < 0{,}05$) (Tabelle 5). Mit dem Ansteigen des p_H werden auch die beobachteten Differenzen zwischen Versuch und Kontrolle geringer. Bei p_H 5,7 (Tabelle 6) ist ebenfalls noch eine Vermehrung des P-Gehaltes der Fraktion I und eine Verminderung des P-Gehaltes sämtlicher übrigen P-Fraktionen gegenüber den Kontrollwerten festzustellen. Einen signifikanten Unterschied weisen jeodch nur die P-Werte der Fraktion I und der Fraktion IV auf. Bei p_H 8,0 (Tabelle 7) sind die beobachteten Unterschiede im Verhalten der P-Werte der einzelnen Fraktionen so gering, daß sie sich praktisch

Tabelle 5. *Kalbshornhauthälften*

Prozentuale Verteilung des säurelöslichen Hornhautphosphors auf die einzelnen Fraktionen. (Fraktion I + II + III + IV = 100%.) a) p_H 3,5; b) p_H 7,2.

	Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 5 Einzelmessungen	52,32	32,15	18,84	22,72	20,13	28,36	8,70	15,75
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$<0{,}05$		$<0{,}05$		$<0{,}05$		$<0{,}05$	

von den Kontrollen nicht mehr unterscheiden. Bei einem p_H von 10,0 beginnen die Werte bereits wieder abzusinken (Tabelle 8).

Aus den mitgeteilten Untersuchungsbefunden kann der Schluß gezogen werden, daß der P-Gehalt der einzelnen Fraktionen durch Änderungen der Wasserstoffionenkonzentration meßbar beeinflußt wird.

Tabelle 6. *Kalbshornhauthälften*

Prozentuale Verteilung des säurelöslichen Hornhautphosphors auf die einzelnen Fraktionen. (Fraktion I + II + III + IV = 100%.) a) p_H 5,7; b) p_H 7,2.

	Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 5 Einzelmessungen	40,77	30,65	19,85	23,67	25,23	28,79	14,14	16,89
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$<0{,}05$		$>0{,}05$		$>0{,}05$		$<0{,}05$	

Tabelle 7. *Kalbshornhauthälften*

Prozentuale Verteilung des säurelöslichen Hornhautphosphors auf die einzelnen Fraktionen. (Fraktion I + II + III + IV = 100%.) a) p_H 8,0; b) p_H 7,2.

	Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 5 Einzelmessungen	30,96	31,57	23,36	23,25	28,70	28,78	16,97	16,40
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$>0{,}05$		$>0{,}05$		$>0{,}05$		$>0{,}05$	

Tabelle 8. *Kalbshornhauthälften*

Prozentuale Verteilung des säurelöslichen Hornhautphosphors auf die einzelnen Fraktionen. (Fraktion I + II + III + IV = 100%.) a) p_H 10,0; b) p_H 7,2.

	Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 5 Einzelmessungen	33,28	31,01	28,26	24,21	24,10	28,64	14,36	16,13
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$>0{,}05$		$<0{,}05$		$<0{,}05$		$<0{,}05$	

4. Untersuchungen über den Einfluß von stoffwechselwirksamen Substanzen

a) Kaliumcyanid. Kaliumcyanid hemmt den eisenkatalytischen Anteil der Atmung (Cytochrom-Cytochromoxydase-System), läßt jedoch die dehydrierenden Fermentsysteme unverändert. Kaliumcyanid beeinflußt die ^{32}P-Aufnahme in die isolierte Rinder- und Kaninchenlinse (MÜLLER und Mitarbeiter) und die Sauerstoffaufnahme der Hornhaut (ROBBIE, LEINFELDER u. DUANE). Die Formazanbildung in der über-

lebenden Rindercornea wird nicht beeinträchtigt (JAEGER). Die Wasseraufnahme in die Hornhäute von Katzen und Kaninchen wird durch Cyanid in bestimmten Konzentrationen verstärkt (PHILPOT; SCHWARTZ, DANES u. LEINFELDER).

In unseren eigenen Untersuchungen haben wir KCN in einer Konzentration von 1:1000 angewandt. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 9 zu ersehen. Bei Gegenwart von KCN in der von uns angewandten Konzentration weichen die in der Fraktion I und in der Fraktion IV gemessenen P-Werte von den Kontrollen kaum ab und die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant. Die P-Werte der Fraktion II und der Fraktion III sind deutlich erniedrigt. Die Wahrscheinlichkeit der Abweichung ist $<0{,}05$ (Tabelle 9).

Tabelle 9. *Kalbshornhauthälften*

Prozentuale Verteilung des säurelöslichen Hornhautphosphors auf die einzelnen Fraktionen. (Fraktion I + II + III + IV = 100%.) a) KCN (1:1000); b) ohne KC.

	Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 10 Einzelmessungen	31,57	29,61	21,83	24,32	25,85	29,19	18,25	19,32
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$>0{,}05$		$<0{,}05$		$<0{,}05$		$>0{,}05$	

b) Natriumfluorid. Untersuchungen von EMBDEN, MEYERHOF, LOHMANN, ROHDEWALD u. a. haben ergeben, daß NaF hemmend in den Abbau der Kohlenhydrate eingreift. An der isolierten überlebenden Kaninchenlinse führt Zusatz von NaF zu einer Hemmung der ^{32}P-Aufnahme in die gesamte Linse und zu einer Verminderung des ^{32}P-Einbaues in die elektrophoretisch getrennte ATP-Fraktion (MÜLLER und Mitarbeiter). NaF hemmt in bestimmten Konzentrationen den Glucoseabbau in der isolierten überlebenden Rindercornea (HERRMANN u. HICKMAN) und erhöht die Wasseraufnahme isolierter Kaninchen- und Katzenhornhäute (PHILPOT).

Die Ergebnisse der von uns durchgeführten Untersuchungen sind aus Tabelle 10 zu ersehen. Fraktion I und IV unterscheiden sich hinsichtlich der gemessenen P-Werte nur unwesentlich von den Kontrollen. Lediglich bei Fraktion II und bei Fraktion III ist die Wahrscheinlichkeit der Abweichung $<0{,}05$. Der organische Rest-P (Fraktion II) läßt einen geringgradigen Anstieg, die ATP-Fraktion (III) einen geringgradigen Abfall ihrer Werte gegenüber den Kontrollwerten erkennen.

NaF in einer Konzentration von 1:1000 beeinflußt demnach das Verhalten der einzelnen Phosphatfraktionen in den Hornhautgeweben nur geringgradig.

Tabelle 10. *Kalbshornhauthälften*

Prozentuale Verteilung des Säurelöslichen Hornhautphosphors auf die einzelnen Fraktionen. (Fraktion I + II + III + IV = 100%.) a) NaF (1:1000); b) ohne NaF.

	Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 10 Einzelmessungen	29,36	29,11	24,87	23,37	27,46	28,09	18,32	19,44
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$>0{,}05$		$<0{,}05$		$<0{,}05$		$>0{,}05$	

c) Monojodessigsäure. Lundsgaard hat erstmals festgestellt, daß Monojodessigsäure die Glykolyse hemmt. Untersuchungen, die von Müller und Mitarbeiter über die ^{32}P-Aufnahme in die isolierte überlebende Kaninchenlinse durchgeführt wurden, lassen bei Zusatz von Monojodessigsäure (MJE) zu den Versuchsansätzen eine ähnliche Wirkung erkennen, wie sie bereits bei Anwesenheit von KCN und NaF beobachtet wurde. Die Formazanbildung in isolierten überlebenden Kalbs- und Rinderhornhäuten wird durch Zufuhr von MJE gehemmt (Köhler, Münich u. Scharf; Jaeger). Der Abbau von Glykogen im Epithel isolierter Rinderhornhäute wird durch Jodacetat nicht gestört (Herrmann u. Hickman). Zufuhr von Jodacetat übt jedoch einen deutlichen Einfluß auf die einzelnen Phosphatfraktionen der gesamten Hornhaut aus. Histochemische Untersuchungen, die von Grethe, Köhler, Münich u. Scharf an der isolierten überlebenden Kalbscornea durchgeführt wurden, haben ergeben, daß durch MJE in einer Konzentration von 1:1000 die glycerophosphatspaltende alkalische Phosphatase gehemmt wird. Die durch Einpflanzung eines Kupferspans in das Hornhautparenchym hervorgerufene aseptische Keratitis am Kaninchenauge wird durch MJE abgeschwächt (Köhler, Scharf, Mauer, Münich). Die ^{32}P-Aufnahme in die isolierte Kalbscornea wird durch MJE (1:1000) gehemmt (Münich).

In unseren Untersuchungen wurde eine MJE-Konzentration von 1:1000 zur Anwendung gebracht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt. Der P-Gehalt von Fraktion I ist unter dem Einfluß von MJE deutlich vermehrt. Fraktion III und Fraktion IV weisen eine signifikante Verminderung ihrer P-Werte auf. Beim organischen Rest-P (Fraktion II) konnte kein signifikanter Unterschied gegenüber den Kontrollwerten festgestellt werden.

d) Phlorrhizin. Phlorrhizin beeinflußt Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsvorgänge (Lundsgaard; Lotspeich; Rohdewald). Über die Wirkung von Phlorrhizin am Auge liegen jedoch nur wenige Untersuchungen vor. Nordmann und Mitarbeiter konnten bei phlorrhizinvergifteten Kaninchen regelmäßig das Auftreten einer Katarakt

Tabelle 11. *Kalbshornhauthälften*

Prozentuale Verteilung des säurelöslichen Hornhautphosphors auf die einzelnen Fraktionen. (Fraktion I + II + III + IV = 100%.) a) Monojodessigsäure 1:1000); b) ohne Monojodessigsäure.

	Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 10 Einzelmessungen	35,30	29,52	24,00	21,56	24,44	29,08	16,26	19,78
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$<0{,}05$		$>0{,}05$		$<0{,}05$		$<0{,}05$	

beobachten. Die Autoren führen diese Erscheinung auf die durch das Phlorrhizin hervorgerufene Störung des Kohlenhydratstoffwechsels zurück. Köhler, Münich u. Scharf konnten die Formazanbildung an der isolierten überlebenden Kalbscornea durch Zusatz von Phlorrhizin deutlich hemmen. Die alkalische Phosphatase der Hornhaut läßt nach Zusatz von Phlorrhizin eine Aktivitätsverminderung erkennen. Die durch den Einfluß von Hyaluronidase hervorgerufene Aktivierung der alkalischen Hornhautphosphatase kann durch Phlorrhizin wieder aufgehoben werden (Grethe, Köhler, Münich u. Scharf).

In den von uns durchgeführten Untersuchungen wurde Phlorrhizin in einer Konzentration von m/50 zur Anwendung gebracht. Aus der Tabelle ist ersichtlich (Tabelle 12), daß durchschnittlich unter dem Einfluß von Phlorrhizin eine Erhöhung der gemessenen P-Werte in Fraktion I und in Fraktion II und ein Absinken der P-Werte in den Fraktionen III und IV nachzuweisen ist. Statistisch signifikante Unterschiede finden sich jedoch nur bei der ATP-Fraktion (Fraktion III).

Tabelle 12. *Kalbshornhauthälften*

Prozentuale Verteilung des säurelöslichen Hornhautphosphors auf die einzelnen Fraktionen. (Fraktion I + II + III + IV = 100%.) a) Phlorrhizin (m/50); b ohne Phlorrhizin.

	Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 10 Einzelmessungen	31,02	29,34	24,38	22,63	26,83	29,33	17,97	18,71
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$>0{,}05$		$>0{,}05$		$<0{,}05$		$>0{,}05$	

e) Urethan. Urethan wirkt unspezifisch und führt zu einer reversiblen Atmungshemmung (Loebel). Am isolierten Rinderauge wirkt Urethan auf die Hornhaut ausgesprochen quellungsfördernd (Pau).

In unseren Untersuchungen wurde Urethan der Nährlösung im Verhältnis 1:10 zugesetzt. In diesen Dosen führt Urethan nach den Angaben von Pau zur Trübung und Quellung der Hornhaut. Die Versuchsergebnisse lassen einen Anstieg der P-Werte von Fraktion I und einen Abfall der P-Werte von Fraktion II, III und IV gegenüber den Kontrollwerten erkennen (Tabelle 13). Die Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) errechnete sich in allen Fällen $< 0{,}05$.

Tabelle 13. *Kalbshornhauthälften*

Prozentuale Verteilung des säurelöslichen Hornhautphosphors auf die einzelnen Fraktionen. (Fraktion I + II + III + IV = 100%.) a) Urethan (1:10); b) ohne Urethan.

	Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 10 Einzelmessungen	38,55	28,85	23,11	26,15	18,94	29,03	16,31	19,02
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$< 0{,}05$		$< 0{,}05$		$< 0{,}05$		$< 0{,}05$	

f) 2,4-Dinitrophenol. 2,4-Dinitrophenol ist einer der bekanntesten Vertreter einer Stoffgruppe, die eine Steigerung der Verbrennungsvorgänge durch Störung der Energieproduktion bewirken (Loomis u. Lipmann; Green und Mitarbeiter). In bestimmten Konzentrationen führt es zur Entkoppelung von Atmung und oxydativer Phosphorylierung. Einen ähnlichen Wirkungsmechanismus besitzt das Thyroxin (Martius).

Am Auge wurde nach der Anwendung von 2,4-Dinitrophenol (z. B. bei Entfettungskuren) das Auftreten von Katarakten beobachtet (Horner; Boardman; Cogan; Lazar; Helminen; Vogt). Müller und Mitarbeiter erzeugten bei jungen Hähnen durch Vergiftung mit 2,4-Dinitrophenol Linsentrübungen. Im Experiment kann die Dehydrasentätigkeit der Linse durch 2,4-Dinitrophenol gehemmt werden (Pau). 2,4-Dinitrophenol in einer Dosierung, die eine Störung des ATP-Stoffwechsels erwarten läßt, führt nach Philpot zu einer Schädigung des Hornhautstoffwechsels.

Wir haben nun in unseren eigenen Untersuchungen die Frage geprüft, ob durch 2,4-Dinitrophenol ein Einfluß auf die säurelöslichen Phosphatfraktionen der Kalbscornea ausgeübt wird. Den einzelnen Versuchsansätzen wurde 2,4-Dinitrophenol in einer Konzentration von $1{,}5 \cdot 10^{-3}$ m/ml zugesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengestellt. Nach der Einwirkung von 2,4-Dinitrophenol ist zwar ein Abfall der Werte in Fraktion III (ATP) und Fraktion IV (ADP) zu erkennen, doch konnten die Ergebnisse statistisch nicht gesichert werden.

Tabelle 14. *Kalbshornhauthälften*

Prozentuale Verteilung des säurelöslichen Hornhautphosphors auf die einzelnen Fraktionen. (Fraktion I + II + III + IV = 100%.) a) 2,4-Dinitrophenol ($1{,}5 \cdot 10^{-3}$ m/ml); b) ohne 2,4-Dinitrophenol.

	Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 8 Einzelmessungen	28,79	28,19	27,36	24,58	24,65	26,21	19,69	21,02
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$>0{,}05$		$>0{,}05$		$>0{,}05$		$>0{,}05$	

g) Ammoniumnitrat. Holzer hat in Untersuchungen an lebenden Hefezellen nachgewiesen, daß Zusatz von Ammoniumnitrat die Phosphorylierungsvorgänge verstärkt.

Es schien uns interessant, die Frage zu klären, ob der Energiestoffwechsel der überlebenden Hornhaut durch Zugabe von Ammoniumnitrat zu den Versuchsansätzen in Konzentrationen, die an lebenden Hefezellen eine Phosphorylierungssteigerung hervorrufen, meßbar beeinflußt wird. Zu diesem Zwecke wurde Ammoniumnitrat in einer Konzentration von 1:1000 den entsprechenden Reaktionsansätzen hinzugefügt. Die gemessenen P-Werte in den einzelnen Fraktionen lassen nach der Einwirkung von NH_4NO_3 in Fraktion III und Fraktion IV einen geringgradigen Anstieg gegenüber den Kontrollwerten erkennen. Ein signifikanter Unterschied der Werte konnte jedoch nur bei Fraktion IV (ADP) festgestellt werden (Tabelle 15).

Tabelle 15. *Kalbshornhauthälften*

Prozentuale Verteilung des säurelöslichen Hornhautphosphors auf die einzelnen Fraktionen. (Fraktion I + II + III + IV = 100%.) a) Ammoniumnitrat (1:1000); b) ohne Ammoniumnitrat.

	Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 10 Einzelmessungen	27,56	28,25	24,75	25,34	28,15	27,71	19,53	18,70
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$>0{,}05$		$>0{,}05$		$>0{,}05$		$<0{,}05$	

h) Colchicin. Colchicin besitzt als Capillar- und Mitosegift toxikologische Bedeutung (Dustin). Es übt eine fibroblastenhemmende Wirkung aus (Benitez und Mitarbeiter), vermindert die Einwanderungsrate von Leukocyten in die unter die Rückenhaut des Kaninchens eingepflanzte Kalbshornhaut (Köhler und Mitarbeiter) und beeinflußt deutlich die Mitosetätigkeit im Corneaepithel von Ratten- und Rinder-

hornhäuten in vivo und in vitro (Buschke und Mitarbeiter). Colchicin hemmt im sauren Milieu die Erythrocytenphosphatase (Schoetensack). Untersuchungen, die von Lettré u. Albrecht an Fibroblastenkulturen durchgeführt wurden, scheinen zu beweisen, daß die Wirksamkeit des Colchicins von dem Gehalt der Zelle an ATP abhängig ist. In der Muskulatur wird die Adenosintriphosphatase und das kreatinphosphorsäurespaltende Ferment durch Colchicin gehemmt (Lettré u. Fritsch).

Es erschien uns interessant, die Frage zu untersuchen, ob durch Colchicin in vitro in Dosen, die Mitose und Phosphatstoffwechsel nachgewiesenermaßen beeinflussen, das Verhalten der von uns getrennten säurelöslichen P-Fraktionen der Hornhaut verändert wird. Zu diesem Zwecke wurde Colchicin in einer Konzentration von 1:10000 der Nährlösung zugesetzt. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 16 ersichtlich. Aus ihr geht hervor, daß durch Colchicin in den von uns gewählten Dosen und unter den dargebotenen experimentellen Bedingungen das Verhalten der P-Werte in den einzelnen Fraktionen nicht signifikant beeinflußt wird.

Tabelle 16. *Kalbshornhauthälften*

Prozentuale Verteilung des säurelöslichen Hornhautphosphors auf die einzelnen Fraktionen. (Fraktion I + II + III + IV = 100%.) a) Colchicin (1:10000); b) ohne Colchicin.

	Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 10 Einzelmessungen	30,75	32,31	21,57	21,85	27,38	26,14	20,30	19,69
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$>0{,}05$		$>0{,}05$		$>0{,}05$		$>0{,}05$	

II. Untersuchungen an der Kaninchencornea

1. Untersuchungen an der normalen Kaninchencornea

Die nachfolgenden Untersuchungen wurde zu dem Zwecke durchgeführt, um festzustellen, ob zwischen der Hornhaut des rechten und des linken Auges des jeweils im Versuch befindlichen Kaninchens unter normalen Umständen Unterschiede im Verhalten des Gesamt-P und der säurelöslichen P-Fraktionen zu erwarten sind. Weiterhin sollte festgestellt werden, ob der am rechten und am linken Auge desselben Kaninchens subconjunktival verabfolgte radioaktive Phosphor (^{32}P) in die gesamte Cornea und in die säurelöslichen Phosphatfraktionen eingebaut wird und ob bei gleicher ^{32}P-Konzentration ein gleichmäßiger Einbau in die Hornhaut des rechten und des linken Auges erfolgt.

Es ist bekannt, daß radioaktiver Phosphor (^{32}P) sehr schnell an den Stoffwechselvorgängen im Gewebe teilnimmt. ^{32}P tritt in menschliche

Erythrocyten über und verteilt sich partiell auf den gesamten labilen säurelöslichen Phosphor (Hevesy). Es tritt eine rasche enzymatische Austauschreaktion mit dem ATP und anderen labilen organischen Phosphorverbindungen ein. Untersuchungen, die von Ideka und Mitarbeiter am Kaninchenauge durchgeführt wurden, haben ergeben, daß ^{32}P, der an einem Auge subconjunctival verabfolgt wurde, sehr schnell in die Augengewebe eindringt und auf dem Blutwege auf das andere Auge übertragen wird. Palm konnte auf autoradiographischem Wege nachweisen, daß intraperitoneal an Meerschweinchen verabfolgter ^{32}P bereits nach 1—$1^1{}_2$ Std in die Augengewebe eingedrungen ist. Die stärkste Speicherung von ^{32}P ist im Bereich der vorderen Uvea (Ciliarkörper und Iris) nachweisbar. Die Hornhaut nimmt weniger ^{32}P auf.

Die Ergebnisse der von uns durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß sowohl die absoluten P-Mengen (Tabelle 17) als auch die Einbaurate von radioaktivem Phosphor (Tabelle 18) am rechten und am linken Auge desselben Kaninchens nur geringfügige Unterschiede aufweisen, die statistisch ausgewertet, nicht signifikant sind. Die Wahrscheinlichkeit der Abweichung ist in allen Fällen $> 0{,}05$.

Tabelle 17. *Kaninchenhornhäute*

Prozentuale Verteilung des säurelöslichen Hornhautphosphors auf die einzelnen Fraktionen. (Fraktion I + II + III + IV = 100%.) a) Normale Kaninchenhornhäute (rechtes Auge); b) normale Kaninchenhornhäute (linkes Auge).

	Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 5 Einzelmessungen	36,69	37,13	23,36	23,67	24,28	23,78	15,69	15,42
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$> 0{,}05$		$> 0{,}05$		$> 0{,}05$		$> 0{,}05$	

Tabelle 18

Prozentuale ^{32}P-Aufnahme je Gramm Hornhauttrockengewicht in die gesamte Cornea und in die säurelöslichen phosphorhaltigen Fraktionen. ^{32}P-Aufnahme in die gesamte Cornea (A): Impulse je Minute in der subconjunctival verabfolgten NaCl-Lösung = 100%; ^{32}P-Aufnahme in die einzelnen Fraktionen (I–IV): Fraktion I + II + III + IV = 100%. a) Normale Kaninchenhornhäute (rechtes Auge); b) normale Kaninchenhornhäute (linkes Auge).

	A		Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
ithmetisches Mittel us 5 Einzelmessungen	51,057	51,714	63,67	63,66	11,05	11,04	16,92	16,87	8,37	8,43
ahrscheinlichkeit der bweichung (P) . .	$> 0{,}05$		$> 0{,}05$		$> 0{,}05$		$> 0{,}05$		$> 0{,}05$	

2. Untersuchungen an der entzündlich veränderten Kaninchencornea

Die Entzündung spielt in der Pathologie der Hornhaut eine besondere Rolle. Ihr Ablauf zeigt im gefäßlosen Gewebe der Hornhaut grundsätzlich dasselbe histologische Bild, wie es bei der Entzündung gefäßhaltigen Bindegewebes beobachtet wird, nur verlaufen Emigration und Exsudation einerseits, die Zellwucherung andererseits an getrennten Orten. In dem eigentlichen Entzündungsherd fehlen im Anfang nur die Gefäße.

Der Ablauf der Entzündung ist, wie überall im lebenden Gewebe, so auch in der Hornhaut, von eingreifenden Stoffwechselveränderungen begleitet. Untersuchungen von Frunder haben gezeigt, daß entzündungserregende Gewebsreize den oxydativen Zellstoffwechsel hemmen und infolge gesteigerter Glykogenspaltung zur Ausbildung einer Acidose führen. Die Acidose geht zeitlich und in ihrem Ausmaß der Stärke und Dauer der Oxydationsbehinderung parallel. Besonders empfindlich gegenüber Sauerstoffmangel sind ATP und Co-Cymase, die sich unter diesen Umständen rasch im Gewebe vermindern (Colldahl). Fleckenstein konnte nachweisen, daß durch entzündungserregende Schmerzstoffe eine Hemmung der oxydativ-assimilatorischen und ein Überwiegen der dissimilatorisch-glykogenolytischen Prozesse im Gewebe hervorgerufen wird. An der durch Bienengift geschädigten Kaninchencornea fand Jaeger eine Hemmung der Formazanbildung von 75—80% gegenüber der unbehandelten Kontrollcornea. de Simone konnte an Kaninchen, bei denen experimentell eine Keratitis neuroparalytica erzeugt wurde, eine Herabsetzung von Atmung und Glykolyse der Hornhaut beobachten.

Die nachfolgenden Untersuchungen wurden unternommen, um die Frage zu klären, ob bei der experimentell erzeugten Keratitis Stoffwechselstörungen auftreten, die zu einer Beeinflussung des Verhaltens der von uns getrennten säurelöslichen P-Fraktionen führen.

a) Bienengift-Keratitis. Die Bienengift-Keratitis wurde jeweils am rechten Auge des im Versuch befindlichen Kaninchens durch Injektion von 0,1 cm^3 Bienengiftlösung 1:1000 in die Vorderkammer erzeugt. Das linke Auge diente zur Kontrolle. Zur Injektion in die Vorderkammer wurde die sog. Fraktion I (Neumann und Mitarbeiter) des Bienengiftes verwendet, die nach Untersuchungen von Habermann am Kaninchenauge entzündungserregend wirkt. In die Vorderkammer eingebrachtes Bienengift führt innerhalb von 24 Std neben einer starken Chemosis der Bindehäute zu einer dichten Hornhauttrübung, die im Spaltlampenbild zwei deutlich voneinander abgesetzte Trübungsschichten erkennen läßt. Die Tötung der Tiere sowie die Excision und die weitere Verarbeitung der Hornhäute erfolgte 25 Std nach der Bienengiftinjektion in die Vorderkammer.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen sind in den Tabellen 19 und 20 zusammenegstellt. Aus ihnen ist zu ersehen, daß an der entzündlich veränderten Cornea der organische Rest-P (Fraktion II) einen Anstieg, die ATP-Fraktion (Fraktion III) dagegen ein Absinken der absoluten P-Werte aufweist. Bei Fraktion I und bei Fraktion IV war $P > 0{,}05$. Die ^{32}P-Aufnahme in die gesamte Cornea in die Fraktion I und in die Fraktion II ist deutlich erhöht, die ^{32}P-Aufnahme in die Fraktion III (ATP) und in die Fraktion IV (ADP) ist signifikant erniedrigt.

Tabelle 19. *Kaninchenhornhäute*

Prozentuale Verteilung des säurelöslichen Hornhautphosphors auf die einzelnen Fraktionen. (Fraktion I + II + III + IV = 100%.) a) Bienengift-Keratitis (rechtes Auge); b) Kontrolle (linkes Auge).

	Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 10 Einzelmessungen	34,37	33,46	27,15	19,98	23,67	30,74	14,81	15,92
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$>0{,}05$		$<0{,}05$		$<0{,}05$		$>0{,}05$	

Tabelle 20. *Kaninchenhornhäute*

Prozentuale ^{32}P-Aufnahme je Gramm Hornhauttrockengewicht in die gesamte Cornea und in die säurelöslichen phosphorhaltigen Fraktionen. ^{32}P-Aufnahme in die gesamte Cornea (A): Impulse je Minute in der subconjunctival verabfolgten NaCl-Lösung = 100%; ^{32}P-Aufnahme in die einzelnen Fraktionen (I—IV): Fraktion I + II + III + IV = 100%. a) Bienengift-Keratitis (rechtes Auge); b) Kontrolle (linkes Auge).

	A		Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 10 Einzelmessungen	61,06	44,98	71,86	62,62	15,01	6,87	9,47	21,41	3,66	9,10
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$<0{,}05$		$<0{,}05$		$<0{,}05$		$<0{,}05$		$<0{,}05$	

b) Keratitis anaphylactica. Das Erscheinungsbild vieler allergischer Reaktionen besteht in einer Ausbildung entzündlicher, ödematöser oder mehr oder weniger zellreicher Veränderungen. Sie haben histologisch meist ein ähnliches Aussehen, wie aus anderen Ursachen entstandene unspezifische Entzündungen. Im allergisch veränderten Gewebe ist ebenfalls eine Acidose nachweisbar (Frunder). Es treten also bei den allergisch bedingten Gewebsveränderungen offenbar ähnliche Stoffwechselstörungen auf, wie sie bei der unspezifischen Entzündung beobachtet wurden. Die Protease in Geweben und Serum ist bei der anaphylaktischen Entzündung des Meerschweinchens erhöht (Ungar).

Sogenannte Allergosen spielen am Auge eine große Rolle, da mit Ausnahme der Linse alle Gewebe des Augapfels allergisch erkranken können. An der Hornhaut läßt sich eine anaphylaktische Reaktion, wie Untersuchungen von v. Szily, Arisawa, Wessely u. Riehm zeigen, sehr leicht durch Injektion von Pferdeserum erzeugen. Wir haben eine anaphylaktische Reaktion an der Hornhaut auf zwei verschiedene Arten hervorgerufen und ihre Auswirkung auf das Verhalten der säurelöslichen P-Fraktionen untersucht.

α) Anaphylaktische Reaktion an der Stelle der ersten Allergenzufuhr (sog. Wesselysches Phänomen). Zu diesem Zwecke erhielten völlig unvorbehandelte Kaninchen einmalig in die Hornhaut eine Menge von 0,05 cm³ Pferdeserum injiziert. Wie bereits Wessely feststellen konnte, kommt es bei so vorbehandelten Tieren nach Ablauf von 11—12 Tagen in einem Teil der Fälle zu einer Infiltration der Injektionsstelle und zu einer Trübung der umliegenden Hornhautanteile. Es besteht in einem ausgeprägten Ödem sämtlicher Hornhautschichten. Histologisch findet sich in diesen Fällen eine zellige Infiltration der mittleren und vorderen Hornhautlamellen (v. Szily). Die Tiere, bei denen diese Reaktion auftrat, wurden getötet und die Hornhäute beider Augen wie üblich bearbeitet. Die Versuchsergebnisse (Tabelle 21—22) lassen beim Vorliegen einer Keratitis anaphylactica Veränderungen der absoluten P-Werte in den einzelnen Fraktionen erkennen. Der P-Gehalt von Fraktion I ist gegenüber den Kontrollhornhäuten stark erhöht, der P-Gehalt von Fraktion III und von Fraktion IV ist erniedrigt. Die P-Werte in Fraktion II sind statistisch nicht signifikant verändert. Die ^{32}P-Aufnahme in die gesamte Cornea und in die Fraktion I ist erhöht, in die Fraktion III und IV erniedrigt. Die Werte der Fraktion II sind dagegen statistisch nicht signifikant verändert.

Tabelle 21. *Kaninchenhornhäute*

Prozentuale Verteilung des säurelöslichen Hornhautphosphors auf die einzelnen Fraktionen. (Fraktion I + II + III + IV = 100%.) a) Keratitis anaphylactica (Wesselysches Phänomen, rechtes Auge); b) Kontrolle (linkes Auge).

	Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 9 Einzelmessungen	35,69	25,52	27,18	26,03	21,74	28,44	15,38	18,9
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$<0{,}05$		$>0{,}05$		$<0{,}05$		$<0{,}05$	

β) Anaphylaktische Reaktion des schon vorher allergisierten Tieres an der Stelle der direkten Allergenbelastung (sog. Phänomen von v. Szily *u.* Arisawa*).* Die Kaninchen erhielten zunächst 0,05 cm³ Pferdeserum am

Tabelle 22. *Kaninchenhornhäute*

Prozentuale ^{32}P-Aufnahme je Gramm Hornhauttrockengewicht in die gesamte Cornea und in die säurelöslichen phosphorhaltigen Fraktionen. ^{32}P-Aufnahme in die gesamte Cornea (A): Impulse je Minute in der subconjunctival verabfolgten NaCl-Lösung = 100%; ^{32}P-Aufnahme in die einzelnen Fraktionen (I—IV): Fraktion I + II + III + IV = 100%. a) Keratitis anaphylactica (Wesselysches Phänomen, rechtes Auge); b) Kontrolle (linkes Auge).

	A		Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 9 Einzelmessungen	68,78	50,14	69,23	44,37	15,46	20,00	9,20	23,35	8,97	23,35
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$< 0{,}05$		$< 0{,}05$		$> 0{,}05$		$< 0{,}05$		$< 0{,}05$	

rechten Auge intracorneal verabfolgt. Kam es nach Ablauf von 11 oder 12 Tagen nicht zum Auftreten eines Wesselyschen Phänomens der Hornhaut, dann wurden am 14. Tage nach der ersten intracornealen Injektion 0,05 cm^3 Pferdeserum an die Stelle der ersten Allergenzufuhr reinjiziert. In solchen Fällen setzte unmittelbar nach der Reinjektion bei der Mehrzahl der Tiere eine anaphylaktische Keratitis ein, die sich klinisch nicht von der unter α geschilderten Form unterschied. v. Szily fand in solchen Fällen histologisch das Hornhautparenchym von zahlreichen mononucleären Leukocyten sowie von eosinophilen Zellen und Klasmatocyten durchsetzt.

Die Tiere wurden nach dem Auftreten der anaphylaktischen Keratitis getötet und die Hornhäute wie üblich verarbeitet. Die Versuchsergebnisse sind aus den Tabellen 23—24 zu ersehen. Die absoluten P-Werte sind in Fraktion I erhöht, in Fraktion III und IV erniedrigt. Bei Fraktion II ist $P > 0{,}05$. Die ^{32}P-Aufnahme in die gesamte Cornea sowie in die Fraktion I ist stark erhöht, die ^{32}P-Aufnahme in Fraktion II und III ist signifikant erniedrigt (Tabelle 24). Die ^{32}P-Aufnahme in die Fraktion IV ist nur geringfügig erniedrigt. Die hierbei erhaltenen Werte sind statistisch nicht signifikant.

Tabelle 23. *Kaninchenhornhäute*

Prozentuale Verteilung des säurelöslichen Hornhautphosphors auf die einzelnen Fraktionen. (Fraktion I + II + III + IV = 100%.) a) Keratitis anaphylactica (Phänomen nach v. Szily u. Arisawa, rechtes Auge); b) Kontrolle (linkes Auge).

	Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 5 Einzelmessungen	39,94	31,33	22,3	22,94	23,93	27,88	13,83	17,85
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$< 0{,}05$		$> 0{,}05$		$< 0{,}05$		$< 0{,}05$	

Tabelle 24. *Kaninchenhornhäute*

Prozentuale ^{32}P-Aufnahme je Gramm Hornhauttrockengewicht in die gesamte Cornea und in die säurelöslichen phosphorhaltigen Fraktionen. ^{32}P-Aufnahme in die gesamte Cornea (A): Impulse je Minute in der subconjunctival verabfolgten NaCl-Lösung = 100%. ^{32}P-Aufnahme in die einzelnen Fraktionen (I—IV); Fraktion I + II + III + IV = 100%. a) Keratitis anaphylactica (Phänomen nach v. Szily u. Arisawa, rechtes Auge); b) Kontrolle (linkes Auge).

	A		Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 5 Einzelmessungen	78,97	57,63	67,24	45,99	10,77	16,9	10,52	24,81	11,47	12,29
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$<0{,}05$		$<0{,}05$		$<0{,}05$		$<0{,}05$		$>0{,}05$	

c) Herpes corneae (Keratitis dendritica). Der Herpes corneae in seinen verschiedenen Erscheinungsformen spielt in der Pathologie der Hornhaut eine bedeutende Rolle. Wie Grüter erstmals zeigen konnte, ist es möglich, herpetisches Hornhautmaterial auf die Kaninchencornea zu überimpfen und hier eine herpetische Erkrankung zu erzeugen, die dem menschlichen Herpes corneae sehr ähnlich sieht. Nach Grüter handelt es sich bei der Herpes-Keratitis aller Formen um eine ungewöhnliche, krankhaft gesteigerte Stoffwechselreaktion, die durch das Eindringen eines vermehrungsfähigen X-Fermentes in den Golgi-Apparat der Zellen bedingt ist. Bei der akuten Reaktion wird eine explosive starke CO_2-Bildung, eine pathologische Ausscheidung von fettsauren Substanzen und eine schnelle Teilung der Golgi-Granula hervorgerufen.

Wir haben in unseren Untersuchungen abradiertes Cornealepithel von Patienten, bei denen klinisch die Diagnose einer Keratitis dendritica gestellt wurde, auf das jeweils rechte Auge der Versuchskaninchen überimpft. Zeigte sich, daß die Erkrankung angegangen war, dann wurde am 7. Tage nach der Überimpfung das Tier getötet und die Hornhaut präpariert.

Die Versuchsergebnisse (Tabelle 25 und 26) lassen erkennen, daß beim Vorliegen eines Herpes corneae (Keratitis dendritica) Veränderungen im Verhalten der säurelöslichen P-Fraktionen auftreten. Die absoluten P-Werte lassen eine Erhöhung der Werte für Fraktion I und eine Erniedrigung der Werte für Fraktion III und IV erkennen. Die Werte bei Fraktion II sind nicht signifikant verändert (Tabelle 25). Die ^{32}P-Aufnahme in die Fraktion I ist deutlich erhöht, die ^{32}P-Aufnahme in die übrigen Fraktionen (Fraktion II, III und IV) ist signifikant erniedrigt. Die ^{32}P-Aufnahme in die gesamte Cornea zeigt keine signifikanten Abweichungen der gemessenen Werte gegenüber den Kontrollen.

Tabelle 25. *Kaninchenhornhäute*

Prozentuale Verteilung des säurelöslichen Hornhautphosphors auf die einzelnen Fraktionen. (Fraktion I + II + III + IV = 100%.) a) Herpes corneae (Keratitis dendritica, rechtes Auge); b) Kontrolle (linkes Auge).

	Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 10 Einzelmessungen	40,58	28,63	25,53	24,75	19,31	23,72	14,58	19,64
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$<0{,}05$		$>0{,}05$		$<0{,}05$		$<0{,}05$	

Tabelle 26. *Kaninchenhornhäute*

Prozentuale ^{32}P-Aufnahme je Gramm Hornhauttrockengewicht in die gesamte Cornea und in die säurelöslichen phosphorhaltigen Fraktionen. ^{32}P-Aufnahme in die gesamte Cornea (A): Impulse je Minute in der subconjunctival verabfolgten NaCl-Lösung = 100%; ^{32}P-Aufnahme in die einzelnen Fraktionen (I—IV): Fraktion I + II + III + IV = 100%. a) Herpes corneae (Keratitis dendritica, rechtes Auge); b) Kontrolle (linkes Auge).

	A		Fraktion I		Fraktion II		Fraktion III		Fraktion IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Arithmetisches Mittel aus 10 Einzelmessungen	60,69	53,29	72,72	48,89	11,28	14,33	11,01	24,52	4,98	12,25
Wahrscheinlichkeit der Abweichung (P) . .	$>0{,}05$		$<0{,}05$		$<0{,}05$		$<0{,}05$		$<0{,}05$	

Besprechung und Zusammenfassung der gesamten an der isolierten überlebenden Kalbscornea und der Kaninchencornea gewonnenen Ergebnisse

Die an isolierten überlebenden Kalbshornhäuten gewonnenen Untersuchungsergebnisse lassen erkennen, daß unter dem Einfluß von Veränderungen der Temperatur und der Wasserstoffionenkonzentration sowie von stoffwechselaktiven Substanzen die einzelnen aus dem trichloressigsauren Hornhautextrakt isolierten P-haltigen Fraktionen in der Mehrzahl der Fälle deutliche und statistisch signifikante Unterschiede aufweisen. Nach Entfernung des Hornhautepithels kann in der restlichen Hornhaut eine Abnahme der energiereichen Phosphate (ATP und ADP) und ein Anstieg des Gesamtwertes für anorganischen und Kreatin-P festgestellt werden. Trotzdem ist der Gehalt an ATP und ADP im isolierten Stroma einschließlich Endothel noch relativ groß. So kann daran gedacht werden, daß das Hornhautparenchym bei intakter Hornhaut energiereiche Phosphate für den regen und hinsichtlich der Permeabilitätsleistung besonders aktiven Stoffwechsel des Epithels zur Verfügung stellt.

Temperaturerhöhung auf 85° C, stark saures Milieu sowie eine Reihe von Stoffwechselgiften führen in entsprechender Konzentration zu einer Schädigung des Hornhautstoffwechsels. Unter diesen Umständen nimmt die Hornhaut in verstärktem Maße Wasser auf, was äußerlich an einer Verdickung der gesamten Hornhautsubstanz erkennbar ist. Von verschiedenen Untersuchern konnte hierbei der Nachweis geführt werden, daß Fermentsysteme in der Hornhaut geschädigt wurden (Jaeger, Pau). Diese Tatsache ließ vermuten, daß Trübung und Quellung der Hornhaut unter den erwähnten experimentellen Bedingungen mit einem Absinken des Energiestoffwechsels gekoppelt sein müssen. Weisen doch bereits Untersuchungen von Dolének darauf hin, daß ATP für das Klarbleiben der Hornhaut von großer Bedeutung ist. Die Ergebnisse der von uns durchgeführten Untersuchungen sprechen ebenfalls in diesem Sinne. Hornhäute, die dem Einfluß hoher Temperatur (85° C), saurem Milieu (p_H 3,5) sowie Stoffwechelsgiften wie MJE und Urethan ausgesetzt wurden, zeigen durchschnittlich eine Erniedrigung der ATP- bzw. ADP-Werte in Fraktion III und IV sowie eine Erhöhung der Werte für den anorganischen P- und Kreatin-P (Fraktion I). Nach der Einwirkung von KCN ist neben dem P-Wert der Fraktion III auch der sog. organische Rest-P (Fraktion II) signifikant erniedrigt. Nach der Einwirkung von NaF ist ein geringgradiger Anstieg in Fraktion II und ein Abfall der Werte in Fraktion III festzustellen. 2,4-Dinitrophenol führt zu einem geringgradigen, statistisch aber nicht gesicherten Abfall der für ATP und ADP ermittelten Werte. Unter dem Einfluß von Phlorrhizin wird der Gehalt an ATP erniedrigt gefunden. Colchicin bleibt ohne erkennbare Wirkung auf das Verhalten der säurelöslichen P-Fraktionen der Hornhaut. Das phosphorylierungssteigernde Ammoniumnitrat läßt die Werte für ATP und ADP leicht ansteigen, doch ließen sich nur die für ADP erhaltenen Werte statistisch sichern.

Die an entzündlich veränderten Kaninchenhornhäuten durchgeführten Untersuchungen lassen erkennen, daß bei allen experimentell erzeugten Entzündungserscheinungen gleichsinnige Veränderungen im Verhalten der von uns getrennten säurelöslichen P-Verbindungen auftreten.

Der P-Gehalt von Fraktion III (ATP) ist stets erniedrigt; ebenso verhalten sich die absoluten Werte von Fraktion IV (ADP), deren Verminderung lediglich bei der Bienengift-Keratitis nicht signifikant ist. Der P-Gehalt der Fraktion I (anorganischer und Kreatin-P) zeigt mit Ausnahme der Bienengift-Keratitis einen entsprechenden deutlichen Anstieg. Bei der Fraktion II dagegen ist nur bei der Bienengift-Keratitis die Zunahme signifikant.

Die Aufnahme von ^{32}P in die gesamte Cornea wird mit Ausnahme der Keratitis dendritica erhöht gefunden. Verständlicherweise wirkt sich

die Aufnahme des radioaktiven Phosphats in allen Fällen besonders stark in Fraktion I aus. Die ^{32}P-Aufnahme in die ATP-Fraktion III ist dagegen gegenüber den Kontrollen stets erniedrigt. Ebenso verhalten sich die prozentualen Werte der ^{32}P-Aufnahme bei Fraktion IV; lediglich bei der Keratitis anaphylactica (Phänomen von v. Szily u. Arisawa) konnten die für Fraktion IV erhaltenen Werte statistisch nicht gesichert werden. In die Fraktion II trat ^{32}P bei der Bienengift-Keratitis vermehrt ein, bei den anderen Entzündungsarten dagegen vermindert, wobei die Abweichung im Falle der Keratitis anaphylactica (Wesselysches Phänomen) nicht signifikant war.

Die Untersuchungsergebnisse machen wahrscheinlich, daß an der entzündlich veränderten Hornhaut Stoffwechselvorgänge ablaufen, die mit einer Störung des Kohlenhydratstoffwechsels und mit einer Einschränkung der Energieproduktion verbunden sind. Die bei der Entzündung in Erscheinung tretende Hemmung des oxydativen Zellstoffwechsels scheint die geschädigte Hornhaut zu zwingen, ihren Energiebedarf aus der Glykolyse zu decken, die jedoch nur einen Bruchteil der zur Aufrechterhaltung der Zellfunktionen notwendigen Energie liefern kann. Die Folge ist eine Herabsetzung des ATP- und ADP-Gehaltes im entzündlich geschädigten Hornhautgewebe. Diese führt zwangsläufig zu einem Mißverhältnis zwischen dem Energiebedarf der Hornhaut und den vorhandenen Möglichkeiten, ihn zu decken. Infolge des Darniederliegens der Energieproduktion kann der ungehemmte Flüssigkeitseinstrom nicht verhindert werden, der zu einer Auflockerung der Struktur und zu einer Verschiebung des kolloidosmotischen Gleichgewichtes im Gewebe beiträgt. Klinisch tritt die verstärkte Wasseraufnahme als weißliche Verfärbung klar in Erscheinung; bei unseren Untersuchungen führt sie in der Mehrzahl der Fälle zu einem Anstieg der absoluten P-Werte und zu einer verstärkten Aufnahme von ^{32}P in die gesamte Cornea und besonders in Fraktion I.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg, danken wir für die großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeiten.

Literatur

Bandurski, R. S., and B. Axelrod: The chromatographic identification of some biologically important phosphate esters. J. of Biol. Chem. **193**, 405 (1951). Barron, E. S. G.: Mechanisms of carbohydrate metabolism. Adv. Enzymol. **3**, 149 (1943). — Benitez, H. H., M. Murray u. E. Chargaff: Antagonism between tropolone and colchicine in red fibroblast cultures. Experientia (Basel) **9**, 426 (1953). Berenblum, I., and E. Chain: An improved method for the colorimetic determination of phosphate. Biochemic. J. **32**, 295 (1938). — Bird, R. M., J. D. Evans and L. Becker: The effect of p_H on the metabolism of rabbit bone marrow. J. of Biol. Chem. **178**, 289 (1949). — Boardman, W.: J. Amer. Med. Assoc. **105**, 108 (1935). Zit nach H. Pau, Die Permeabilitätskatarakt. Klin. Mbl. Augenheilk. **124**, 1–29, 129—148 (1954). — Bobbit, B. G., and H. J. Deuel: The rate of glykogenolysis

in the isolated liver of several species of laboratory animals. Amer. J. Physiol. **131**, 521 (1940). — Boyer, P. D., O. J. Koeppe, W. W. Luchsinger and A. B. Falcone: Mechanism of the participation of ATP in enzymic synthesis. Federat. Proc. **14**, 597 (1955). — Bücher, Th.: Probleme des Energietransportes innerhalb lebender Zellen. Adv. Enzymol. **14**, 1—42 (1953). — Burn, J.: Biologische Auswertungsmethoden. Berlin: Springer 1937. — Buschke, W., I. S. Friedenwald and W. Fleischmann: Studies on the mitotic activity of the corneal epithelium. Bull. Johns Hopkins Hosp. **73**, 143 (1943). — Cogan, D. G., and F. C. Cogan: J. Amer. Med. Assoc. **105**, 794 (1935). Zit. nach H. Pau, Die Permeabilitätskatarakt. Klin. Mbl. Augenheilk. **124**, 1—29, 129—148 (1954). — Cogan, D. G., and V. E. Kinsey: Zit. nach F. Adler, Physiology on the eye. IV. The permeability of the cornea. St. Louis: C. V. Mosby Comp. 1953. — Colldahl, H.: Acta med. scand. (Stockh.) **129**, 113 (1947). Zit. nach H. Frunder, Über p_H-Änderungen im ungeschädigten lebenden Gewebe bei Sauerstoffmangel, Kohlensäureanreicherung und Narkose. Pflügers Arch. **252**, 509 (1950). — Dolének, A.: Some considerations on the energetics of the eye. Československ. Oftalm. **10**, 281 (1954). — Dustin: Zit. nach F. Eichholtz, Lehrbuch der Pharmakologie. Berlin: Springer 1947. — Eggleston, L. V., and R. Hems: Separation of adenosinphosphates by paper chromatography and the equilibrium constant of the myokinase system. Biochemic. J. **52**, 156 (1952). — Embden: Zit. nach E. Lehnartz, Einführung in die Chemische Physiologie. Berlin: Springer 1947. — Everett, M. R.: Medical Biochemistry. S. 318—327: Phosphorylation and transphosphorylation. New York u. London: Paul B. Hoeber 1948. — Fleckenstein, A.: Die periphere Schmerzauslösung und Schmerzausschaltung. Frankfurt: Steinkopff 1950. — Fleckenstein, A., u. J. Janke: Papierchromatographische Trennung von ATP, ADP und anderen Phosphorverbindungen im kontrahierten und erschlafften Froschmuskel. Pflügers Arch. **258**, 177—199 (1955). — Friedenwald, J. S.: Summary and some possible interpretations. Bull. John Hopkins Hosp. **82**, 326 (1948). — Friedenwald, J. S., W. Buschke and S. G. Moses: Comparison of the effect of mustard, ultraviolet and X-radiation and cholchicine on the cornea. Bull. Johns Hopkins Hosp. **82**, 312 (1948). — Frohmann, Ch. E., and V. E. Kinsey: Studies on the cristalline lens. V. Distribution of various phosphate-containing compounds and its significance with respect to energetics. Arch. of Ophthalm. **48**, 12—18 (1952). — Frunder, H.: Der Stoffwechsel des entzündeten und geschädigten Gewebes. The symposium on the mechanism of inflammation, Montreal 1953, p. 277. — Gerlach, E., E. Weber u. H. Döring: Einige neue Lösungsmittel für die Papierchromatographie von Phosphorsäureestern. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **226**, 9 (1955). — Papierchromatographische Trennungsmethode für die säurelöslichen Phosphorverbindungen aus Nierengewebe. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **224**, 496 (1955). - Green, D. E., W. F. Loomis and V. Auerbach: J. of Biol. Chem. **172**, 389 (1948). Zit. nach Loomis and Lipmann, Reversible inhibition of the coupling between phosphorylation and oxidation. J. of Biol. Chem. **173**, 807 (1948). — Grethe, H., V. Köhler, W. Münich u. J. Scharf: Histochemische Untersuchungen an der Cornea über den Einfluß von Monojodessigsäure, Phlorrhizin und Hyaluronidase auf die alkalische Phosphatase. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **214**, 398 (1952). - Grüter, W.: Experimentelle und klinische Untersuchungen über den sogenannten Herpes corneae. Ber. dtsch. opthalm. Ges. **42**, 162 (1920). — Die Verbreitung der Elementarganula in den natürlichen Saftbahnen der Hornhaut und ihre Bedeutung für die Morphologie. Ber. dtsch. opthalm. Ges. **54**, 37 (1948). — Habermann, E.: Über Veränderungen von Zellstruktur und Zellstoffwechsel durch tierische Gifte. Habil.-Schr. Würzburg 1955. — Haas, J.: Physiologie der Zelle. Berlin: Gebrüder Borntträger 1955. — Hanes, F. R. S., and

F. A. Isherwood: Separation of the phosphoric esters on the filter paper of chromatogramm. Nature (Lond.) **164**, 1107 (1949). — Helminen, T.: Acta opthalm. (Kobenh.) **15**, 490 (1937). Zit. nach H. Pau, Die Permeabilitätskatarakt. Klin. Mbl. Augenheilk. **124**, 1—29, 129—148 (1954). — Herrmann, H., and F. H. Hickman: Exploratory studies on corneal metabolism. Bull. Johns Hopkins Hosp. **82**, 225 (1948). — Further experiments on corneal metabolism in respect to glucose and lactic acid. Bull. Johns Hopkins Hosp. **82**, 260 (1948). — The consumption of pyruvate acetoin, acetate and butyrate by the cornea. Bull. Johns Hopkins Hosp. **82**, 273 (1948). — The utilisation of ribose and other pentoses by the cornea. Bull. Johns Hopkins Hosp. **82**, 287 (1948). — Herrmann, H., S. G. Moses, and I. S. Friedenwald: Influence of pantocaine hydrochlorid and chlorobutanol on respiration and glycolysis of cornea. Arch. of Ophthalm. **28**, 652 (1942). — Hessing, E. E.: Arch. of Ophthalm. **17**, 513 (1937). Zit. nach H. Pau, Die Permeabilitätskatarakt. Klin. Mbl. Augenheilk. **124**, 1—29, 129—148 (1954). — Hevesy, G. v.: Isotope als Indikatoren in der physiologischen Forschung. Documenta rheumatologica Geigy **6** (1955). — Hevesy, G. v., T. Baranowski, A. J. Guthke, P. Ostern u. J. K. Parnas: Untersuchungen über die Phosphorübertragungen in der Glykolyse und Glykogenolyse. Acta Biol. exper. (Lodz) **7**, 34 (1938). — Holt, M., and D. G. Cogan: Permeability of the excised cornea to ions as determined by measurements of impedance. Arch. of Ophthalm. **35**, 292 (1946). Holzer, H.: Zur Penetration von Orthophosphat in lebende Hefezellen. Biochem. Z. **324**, 144 (1953). — Holzer, H., J. Hahn u. S. Schneider: Zum Mechanismus des anaeroben Glukose- und Fructose-Abbaues in Mäuseascitescarcinom. Biochem. Z. **326**, 451 (1955). — Holzer, H., E. Holzer u. G. Schultz: Zusammenhang zwischen Wachstum und aerober Gärung. Biochem. Z. **326**, 385 (1955). — Horner, W. D., J. R. Barr and W. W. Boardman: J. Amer. Med. Assoc. **105**, 108 (1935). Zit. nach H. Pau, Die Permeabilitätskatarakt. Klin. Mbl. Augenheilk. **124**, 1—29, 129—148 (1954). — Ideka, I. u. Mitarb.: Ophthalmologic studies with P^{32}. First report. Distributions of radioactive phosphor in eye and in whole body. J. Osaka City Med. Center **1**, 128 (1952). — Jaeger, W.: Untersuchungen über dehydrierende Fermentsysteme der Cornea. I. Ergebnisse an der normalen Cornea. Graefes Arch. **154**, 142 (1953). — Untersuchungen über dehydrierende Fermentsysteme der Cornea. II. Die Bedeutung dehydrierender Fermentsysteme für die Pathologie der Cornea. Graefes Arch. **154**, 401—430 (1953). — Untersuchungen über dehydrierende Fermentsysteme der Cornea. III. Einwirkung therapeutisch am Auge verwendeter Medikamente auf dehydrierende Fermentsysteme der Cornea. Graefes Arch. **154** 431 (1953). — Kleifeld, O., H. K. Müller, U. Dardenne, R. Fuchs, O. Hockwin u. P. Arens: Über den ^{32}P-Einbau der normalen Linse in elektrophoretisch trennbare Phosphatfraktionen. Graefes Arch. **156**, 433 (1955). — Kleifeld, O., H. K. Müller, O. Hockwin, P. Arens, R. Fuchs u. U. Dardenne: Über die Bedeutung von Kapsel und Epithel für die Phosphorresorption der Linse. Graefes Arch. **156**, 443 (1955). — Köhler, V., W. Münich u. J. Scharf: Der Einfluß einiger antirheumatischer Substanzen auf Gewebsenzyme. Experientia (Basel) **8** (3), 119 (1952). — Köhler, V., u. J. Scharf: Kohlehydratstoffwechsel und Entzündung. Med. Mschr. **5**, 113 (1951). — Köhler, V., J. Scharf, H. Mauer u. W. Münich: Die Bildung eines aseptischen Cornealabscesses in Abhängigkeit von Monojodessigsäure bzw. Desoxycorticosteronglukosid. Endokrinologie **28**, 293 (1951). — Kohra, T.: Über den Stoffwechsel der Hornhaut. Acta Soc. ophthalm. jap. **39**, 1429 (1935); **40**, 1595, 1984, 1992 (1936). — Lazar, N. K.: J. Amer. Med. Assoc. **105**, 794 (1935). Zit. nach H. Pau, Die Permeabilitätskatarakt. Klin. Mbl. Augenheilk. **124**, 1—29, 129—148 (1954). — Lee jr., D. S., and W. M. Hart: The metabolism of the cornea. Amer. J. Ophthalm. **27**,

488 (1944). — Lehnartz, E.: Einführung in die Chemische Physiologie. Berlin: Springer 1947. — Lettré, H., u. M. Albrecht: Über die Abhängigkeit der Colchicineinwirkung von der ATP. Naturwiss. **38**, 549 (1951). — Lettré, H., u. Fritsch: Angew. Chem. **63**, 429 (1951). Zit. nach H. Lettré u. M. Albrecht, Über die Abhängigkeit der Colchicinwirkung von der ATP. Naturwiss. **38**, 548 (1951). — Lipmann, F.: Metabolic generation and utilisation of phosphate bond energy. Adv. Enzymol. **1**, 115 (1941). — Loeber, R. O.: Beiträge zur Atmung und Glykolyse tierischer Gewebe. Biochem. Z. **161**, 219 (1925). — Lohmann, K.: Über die Isolierung verschiedener natürlicher Phosphorsäureverbindungen und die Frage ihrer Einheitlichkeit. Biochem. Z. **194**, 306 (1928). — Lohmann, K., u. L. Jendrassik: Kolorimetrische Phosphorsäurebestimmungen im Muskelextrakt. Biochem. Z. **178**, 419 (1926). — Loomis, W. F., and F. F. Lipmann: Reversible inhibition of the coupling between phosphorylation and oxidation. J. of Biol. Chem. **173**, 807 (1948). — Lotspeich, W. D.: Mechanism of action of phlorizin in kidney tissue. Federat. Proc. **14**, 307 (1955). — Lundsgaard, E.: Hemmung von Esterifizierungsvorgängen als Ursache der Phlorrhizinwirkung. Biochem. Z. **264**, 209 (1935). — Die säurelöslichen Phosphatverbindungen in der Darmschleimhaut und während der Hexoseresorption. Z. Physiol. Chem. **261**, 194 (1939). — Markham, R., and J. D. Smith: Chromatographic studies of nucleic acids. 1. Technique for the identification and estimation of purine and pyrimidine bases, nucleosides and related substances. Biochem. J. **45**, 294 (1949). — Martius, C.: Die Wirkungsweise des Schilddrüsenhormons. 5. Kolloquium der Ges. für physiol. Chemie, Mosbach 1954. — Meyerhof, O.: Über die Intermediärvorgänge der enzymatischen Kohlehydratspaltung. Erg. Physiol. **39** (1937). — Merriam, F. C., and V. E. Kinsey: Studies on the crystalline lens. I. Technice for in vitro cultures of crystalline lens, and observations on metabolism of the lens. Arch. of Ophthalm. **43**, 979 bis 988 (1950). — Mueller, C. B., and H. B. Hastings: The rate of transfer of phosphorus across the red blood cell membrane. J. of Biol. Chem. **189**, 869—879 (1951). — Glycolysis and phosphate fractions of red blood cells. J. of Biol. Chem. **189**, 881—889 (1951). — Müller, H. K., O. Kleifeld, R. Fuchs, U. Dardenne, O. Hockwin u. P. Arens: Über den ^{32}P-Einbau in die elektrophoretisch trennbaren Phosphatfraktionen der Linse in Abhängigkeit von Lebensalter und der Vergiftung mit Naphthalin, Dinitrophenol und Alloxan. Graefes Arch. **156**, 460—466 (1955). — Münich, W.: Experimentelle Untersuchungen über den Stoffwechsel der normalen und der entzündlich veränderten Hornhaut. Ber. dtsch. ophthalm. Ges. **58**, 172 (1953). — Die Beeinflussung säurelöslicher Phosphorverbindungen, insbesondere von Adenosintriphosphat und Adenosindiphosphat in den Hornhautgeweben durch 3,5-Dioxo-1,2-diphenyl-4-n-butylpyrazolidin. Arzneimittelforsch. **6**, 729 (1956). — Neumann, W.: Untersuchungen über Wirkstoffe und pharmakologische Wirkungen der Gifte von Bienen und Schlangen. Ber. Physik.-med. Ges. Würzburg **66**, 166 (1953). — Neuere Untersuchungen über die Giftstoffe von Bienen und Schlangen. Naturwiss. **41**, 322 (1954). — Neumann, W., u. E. Habermann: Beiträge zur Charakterisierung der Wirkstoffe des Bienengiftes. Arch. exper. Path. u. Pharmakol. **222**, 367 (1954). — Neumann, W., W. Habermann u. G. Amend: Zur papierelektrophoretischen Fraktionierung tierischer Gifte. Naturwiss. **39**, 286 (1952). — Nordmann, J., et P. Mandel: Le métabolisme des glycides dans le cristallin. I. La glycolyse anaérobie. Ann. d'Ocul. **185**, 929 (1952). — Nordmann, J., P. Mandel and M. Achard: Inhibition of sugar metabolism in the lens. Brit. J. Ophthalm. **38**, 673—679 (1954). — Orzalesi, F.: Ricerche sulla respirazione e sulla glicolisi della cornea. Boll. Ocul. **17**, 509 (1939). — Palm, E.: The exchange of phosphate between the blood and the eye studied with the aid of radioautographs. Acta ophthalm. (Københ.) **27**, 267—274 (1949). — Parnas,

J. K.: Glykogenolyse. IV. Enzymgifte. In Handbuch der Enzymologie, Bd. II. Leipzig: Akademische Verlagsanstalt. — Pau, H.: Beitrag zur Physiologie und Pathologie der Hornhaut. Graefes Arch. **154**, 579—602 (1954). — Die Permeabilitätskatarakt. Klin. Mbl. Augenheilk. **124**, 1—29, 129—148 (1954). — Philpot, F. J.: Factors affecting the hydration of the rabbit cornea. J. of Physiol. **128**, 504—510 (1955). — Riehm, W.: Auge und Allergieforschung. In Allergie, herausgeg. von W. Berger u. K. Hansen, S. 680—704. Leipzig: Georg Thieme 1940. — Robinson, J. R., and R. A. McCance: Water metabolism. Annual Rev. Physiol. **14**, 115 (1952). — Robbie, W. A., P. J. Leinfelder and T. D. Duane: Cyanid inhibition of corneal respiration. Amer. J. Ophthalm. **30**, 1381 (1947). — Roetth, A. de: Metabolism of the stored cornea. Arch. of Ophthalm. **44**, 659 (1950). — Rohdewald, M.: Über die Phosphorylase der Leukocyten. Biochem. Z. **323**, 146 (1952). — Schall, E.: Das Vorkommen der Nadi-Oxydasen in den Gewebszellen des Auges in seinen verschiedenen Entwicklungsstufen. Graefes Arch. **115**, 666 (1925). — Schmelzer, H.: Mikrochemische Reaktionen am Ziliarepithel. Ber. dtsch. ophthalm. Ges. **1925**, 259. — Schoetensack, W.: Beeinflussung von Phosphatasen durch Mitosegifte. Naturwiss. **25**, 285 (1948). — Schwartz, B., B. Danes and P. J. Leinfelder: The role of metabolism in the hydration of the isolated lens and cornea. Amer. J. Ophthalm. **38**, 182 (1954). — Simone, S. de: Ricerche sulla respirazione de glicolisi anaerobie della cornea di coniglio in condizione di cheratite neuroparalitica sperimentale. Boll. Ocul. **43**, 129 (1955). — Smelser, G. K., and V. Ozanics: Effect of thyroid hormone on mitosis and regeneration in corneal epithelicum. J. Cellul. a. Comp. Physiol. **43**, 107 (1954). — Soskin, S., and R. Levine: Carbohydrate metabolism. Chicago, **79** (1946). — Sturm, A.: Zellstoffwechsel. Lehrbuch der speziellen Pathologie und Physiologie. Fischer 1945. — Szily, A. v.: Die Anaphylaxie in der Augenheilkunde. Stuttgart: Ferdinand Enke 1914. — Szily, A. v., u. Arisawa: Über die spezifischen Eigenschaften der Augengewebe. Ber. dtsch. ophthalm. Ges. **38**, 253 (1912). — Thompson, R., E. Gallardo and D. Khorazo: Precipitins in the ocular tissue of rabbits generally and locally immunized with cristalline egg albumine. Amer. J. Ophthalm. **19**, 852 (1936). — Ungar, G.: The fibrinolytic system and inflammation. The symposion on the mechanism of inflammation, Montreal 1953, S. 151. — Vogt, A.: Dinitrophenolstar. Klin. Mbl. Augenheilk. **99**, 669 (1937). Wessely, K.: Über anaphylaktische Erscheinungen an der Hornhaut (experimentelle Erzeugung einer parenchymatösen Keratitis durch artfermdes Serum). Münch. med. Wschr. **58**, 32 (1911).

Priv.-Doz. Dr. W. Münich, Universitäts-Augenklinik, Würzburg, Röntgenring 12

Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg